

**Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования
«Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина»**

На правах рукописи

Курбанов Рустем Альбертович

**АНТИТЕЛА К НАТИВНОЙ ДНК
В РАЗВИТИИ АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ
У ДЕТЕЙ ШКОЛЬНОГО ВОЗРАСТА**

03.00.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань - 2007

Работа выполнена в лаборатории биохимии нуклеиновых кислот Казанского государственного университета имени В.И. Ульянова-Ленина и в Татарском государственном гуманитарно-педагогическом университете.

Научный консультант: доктор биологических наук,
профессор Винтер Виктор Георгиевич

Научный руководитель: доктор биологических наук
Абрамова Зинаида Ивановна

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор,
Хазипов Нариман Залилович
(заведующий кафедрой биохимии,
Казанская государственная Академия
ветеринарной медицины имени
Н.Э.Баумана

доктор медицинских наук
Мустафин Ильшат Ганиевич
(заведующий кафедрой биохимии,
Казанский государственный
медицинский университет, г. Казань)

Ведущая организация: ГОУ ВПО Ижевская государственная
медицинская академия (г. Ижевск)

Защита состоится 17 мая 2007 года в «13⁰⁰» часов на заседании
диссертационного совета Д212.081.08 при Казанском государственном
университете по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, главное здание,
ауд. 209.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке
имени Н.И. Лобачевского Казанского государственного университета.

Автореферат разослан “ ” апреля 2007 г.

Ученый секретарь диссертационного Совета,
доктор биологических наук

Абрамова З.И.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы.

В последнее время отмечается повсеместный рост заболеваемости бронхиальной астмой (БА), в том числе среди детей. По социально-экономическому ущербу, влиянию на качество жизни пациентов она вышла на одно из первых мест среди болезней человека. У детей отмечается более ранняя манифестация и утяжеление течения БА, рост инвалидизирующих ее форм (Балаболкин, 2003).

Несмотря на большое число исследований, посвященных различным аспектам патогенеза БА, многие вопросы развития этого тяжелого заболевания остаются ещё малоизученными.

Работами последних лет показана сложность иммунологических нарушений при БА, которые не ограничиваются лишь взаимодействием аллергена с антителами (АТ) класса IgE (Busse and Rosenwasser, 2003). Важное значение, как оказалось, имеет аутоиммунный феномен, который проявляется при некоторых вариантах БА. Более того, по данным литературы имеются предположения, что аллергия и аутоиммунитет могут иметь общие механизмы в патогенетических путях (Rottem and Shoenfeld, 2003).

Несмотря на активное развитие фундаментальных представлений об аутоиммунитете, в дифференциальной диагностике и мониторинге аутоиммунных заболеваний сохраняется ряд проблем, сдерживающих разработку стандартизированной системы диагностических и прогностических критериев оценки развития и прогрессирования заболевания. Одной из таких проблем является феномен поликлональности и полиспецифичности аутоантител (ААТ), лежащий в основе современных представлений об аутоиммунитете и составляющий основу концепции этиопатогенеза аутоиммунных форм патологии (Сучков и др., 2004). Особое место среди них занимают ААТ к ДНК, присутствие которых в сыворотке крови давно используется как клинический признак аутоиммунных заболеваний. Вместе с тем, наличие в организме ДНК-связывающих ААТ независимо от концентрации и фенотипа не является фактором, достаточным для запуска аутоиммунного процесса (Thomas et al., 2002).

Изучение аутоиммунного статуса весьма актуально, так как данных об аутоиммунном характере астмы относительно немного, например, практически не изучено образование и роль АТ к нДНК, уровень внкДНК и ЦИК в сыворотке и их связь с тяжестью болезни.

Цель и задачи исследования

Целью настоящей работы явилось исследование формирования аутоиммунного компонента – АТ к нДНК при atopической бронхиальной астме (АБА) у детей школьного возраста.

В соответствии с основной целью исследования были поставлены следующие задачи:

1. Определить уровень содержания АТ к нДНК в периферической крови детей с АБА.
2. Провести корреляционный анализ показателей содержания АТ к нДНК в сыворотке крови детей с АБА в зависимости от степени тяжести, пола, сезона обследования и возраста.
3. Определить концентрацию внеклеточной ДНК в периферической крови детей с АБА.
4. Изучить корреляционную зависимость концентрации внеклеточной ДНК от степени тяжести, пола, сезона обследования, возраста и уровня АТ к нДНК в периферической крови детей с АБА.
5. Исследовать наличие ДНК-гидролизующей активности среди АТ к нДНК
6. Определить концентрацию и молекулярный размер циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови детей с АБА различной степени тяжести.

Научная новизна

В работе впервые исследованы уровень АТ к нДНК в сыворотке крови детей-школьников с АБА различной степени тяжести и изучена их связь с возрастом больных, половой принадлежностью, сезоном обследования и степенью тяжести заболевания. Впервые установлена прямая корреляция между уровнем содержания АТ к нДНК в сыворотке детей с АБА и степенью тяжести заболевания.

Во всех исследованных образцах сыворотки крови детей с АБА обнаружена внкДНК, концентрация которой коррелирует с уровнем АТ к нДНК.

В сыворотках крови детей со средней и тяжёлой персистирующей астмой выявлена ДНК-абзимная активность, характерная для цитотоксических АТ к нДНК.

В сыворотке крови детей с АБА были обнаружены патогенные ЦИК (мелко-и среднedisперсных размеров), в их составе показано присутствие АТ к нДНК. Степень увеличения концентрации ЦИК и уменьшения их дисперсности коррелирует со степенью выраженности патологии.

Научно-практическая значимость работы

Обнаружение АТ к нДНК в сыворотке периферической крови при АБА, анализ ДНКазной активности АТ к нДНК и изучение динамики изменения размеров ЦИК может служить дополнительным критерием при диагностике астмы и оценки эффективности проводимого лечения у детей критических возрастных периодов.

Положения, выносимые на защиту.

1. Уровень АТ к нДНК и наличие абзимов в сыворотке крови детей с АБА связан с прогрессированием тяжести заболевания.

2. Динамика изменения молекулярного состава (размеров) ЦИК является ведущей и может иметь диагностическую значимость при характеристике заболевания.

3. АБА является парадигмой аутоиммунного заболевания.

Апробация работы.

Основные результаты исследований докладывались на 10-ой Международной Пущинской школе-конференции «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2006); научно-практической конференции молодых ученых Казанской государственной медицинской академии в 2006 г.; VI научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета «Материалы и технологии XXI века» (Казань, 2006); научно-практической конференции «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии» (Казань, 2004); научно-практической конференции молодых ученых Казанского государственного педагогического университета в 2004 г., посвященной к 100-летию О.Д. Курмаева.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 9 научных работ.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 141 страницах машинописного текста, включает 29 рисунка и 17 таблиц. Состоит из введения, 4 глав, выводов и списка литературы, включающего 258 ссылок, из которых 71 на отечественные, 187 на зарубежные работы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Объект исследования. В работе были использованы образцы сывороток крови детей школьного возраста ($n = 193$) из аллергологического отделения Детской Республиканской Клинической Больницы (ДРКБ, г. Казань) с диагнозом «атопическая бронхиальная астма». Диагноз ставился на основании данных аллергологического анамнеза, положительных результатах кожного тестирования, положительного ответа в провокационных ингаляционных пробах, повышенного уровня общего IgE в сыворотке крови. Отрицательным контролем служили сыворотки 21 относительно здорового подростка, предоставленные Дубъязской участковой больницей Высокогорского района РТ. В качестве положительного стандарта использована сыворотка крови больных системной красной волчанкой (СКВ) – пациентов Республиканской Клинической Больницы (РКБ, г. Казань).

Кровь отбирали из локтевой вены в стерильные пробирки (в количестве 5 - 7 мл) и инкубировали при 37°C в течение 1-1,5 часов для формирования сгустка. Образовавшийся сгусток отслаивали от стенок пробирки, после чего кровь инкубировали в течение 2-3 часов при 4°C для ретракции сгустка. Сыворотку декантировали и центрифугировали на центрифуге MPW-210 в течение 5 минут при 1500 об/мин. Надосадочную жидкость отделяли и снова центрифугировали при 5000 об/мин в течение 20 минут для полного удаления оставшихся клеточных элементов. Сыворотку со следами гемолиза отбраковывали. Полученную сыворотку разливали на аликвоты и хранили в замороженном состоянии при -20°C .

Определение антител к нативной ДНК методом иммуноферментного анализа. Определение уровня содержания антител к нДНК проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА), оптимизированным ранее в лаборатории Казанского государственного университета.

В качестве антигена использовали лиофилизированную нДНК эритроцитов цыплят. Исследуемые образцы сывороток крови инкубировали при 56°C в течение 40 мин для инактивации белков системы комплемента и диссоциации иммунных комплексов. Для выявления в лунках планшета антител, связавшихся с ДНК, использовали конъюгированные с пероксидазой антитела против IgG человека фирмы “Сорбент ЛТД” (конъюгат).

ИФА проводили по следующей схеме. В лунки активированных ультрафиолетовым светом планшетов (облучение в течение 2 часов на расстоянии 15 см от источника) вносили раствор ДНК (10 мкг/мл) на 0,1М фосфат – 0,05М цитратном буфере pH 5,0 (ЦБ). Планшеты с сорбируемой ДНК инкубировали в течение ночи при комнатной температуре, после чего не связавшуюся ДНК трижды отмывали фосфатно-солевым буфером с твином (ФСБТ). Далее в подготовленные планшеты вносили образцы сыворотки крови, разведенные ФСБТ в соотношении 1:100, после чего планшеты инкубировали в течение 1,5 часов при 37°C , а затем 0,5 часа при 4°C . По окончании инкубации

планшеты трижды промывали ФСБТ и вносили рабочий раствор конъюгата, приготовленный на ФСБТ. После внесения раствора конъюгата планшеты инкубировали и промывали, как описано выше. После указанных манипуляций планшеты несколько раз ополаскивали дистиллированной водой и вносили субстратную смесь, приготовленную на ЦБ и содержащую 0,05% H_2O_2 и 0,4мкг/мл орто-фенилендиамина. Планшеты с субстратной смесью инкубировали в течение 0,5 часа в темноте при комнатной температуре, после чего измеряли уровень ответа цветной реакции ИФА на спектрофотометре “Multiskan” в единицах оптической плотности при длине волны 492 нм (ОП₄₉₂).

Определение концентрации внеклеточной ДНК. Определение концентрации внеклеточной ДНК проводили флуориметрическим методом с применением красителя Hoechst 33342 (бисбензимидазол) в качестве флуорохрома (De Barro et al., 1995). Уровень флуоресценции растворов измеряли в кварцевых кюветах объемом 0,6 мл на флуоресцентном спектрофотометре «Hitachi MPF-4» (Япония) при длине волны возбуждения 358 нм и длине волны эмиссии 458нм. Чувствительность прибора настраивали таким образом, чтобы раствор, содержащий 1,25 мкг/мл ДНК и 0,24 мкг/мл Hoechst, давал максимальный ответ флуоресценции (85-90 отн. ед.). При определении уровня флуоресценции ДНК в растворах учитывали также и флуоресценцию раствора Hoechst (0,24 мкг/мл) в TNE-буфере.

Определение ДНКазной активности антител к ДНК. Для обнаружения и изучения ДНК-гидролизующей активности анти-ДНК АТ сыворотки крови проводили реакцию *in vitro*. В качестве субстрата использовали коммерческий препарат ДНК плазмиды pBR322, выделенной из штамма E.coli XL-1Blue («СибЭнзим», Россия).

В таблице 1 приведена пропись компонентов инкубационной пробы:

Таблица 1. Стандартная инкубационная проба

	Контроль	Опыт
Плазмидная ДНК, 12.5 мкг/мл	5 мкл	5 мкл
Сыворотка крови, 1:50	—	5 мкл
Гидролизующий буфер	5 мкл	—
Объем реакционной пробы	10 мкл	10 мкл

Исходный препарат плазмидной ДНК и образцы сывороток крови разводили на гидролизующем буфере: 25 mM трис-HCl, pH 7,5, 5 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 50 mM NaCl.

Реакцию гидролиза проводили в динамике, отбирая пробы через кратные промежутки времени (2, 4 и 8 ч) при 37°C. ДНК-гидролизующую способность антител к ДНК оценивали по превращению суперскрученной ДНК плазмиды pBR322 в кольцевую и линейную формы. Оценку результатов гидролиза плазмидной ДНК pBR322 осуществляли методом электрофореза в агарозном геле и обработкой по программе «Scion Image».

Электрофоретический анализ плазмидной ДНК pBR322 в агарозном геле. Проведение электрофореза осуществляли согласно рекомендациям Маниатиса и др. (1984).

Электрофорез проводили в горизонтальном 0,7% агарозном геле, приготовленном на ТВЕ (трис-боратный) буфере (0,09М трис-ОН, 0,09М борная кислота, 0,002М ЭДТА, pH 8.0-8.2). Перед проведением электрофореза в исследуемые пробы добавляли 1,0 мкл 0,25% раствора красителя бромфенолового синего (БФС) на 50%-ном глицерине. В лунки геля осторожно вносили весь объём образцов (10 мкл), устанавливали напряжение 3 В/см. За ходом электрофореза следили по движению красителя. Через 4 часа напряжение отключали. Гель окрашивали путём вымачивания его в буфере ТВЕ, содержащем 1 мкг/мл бромистого этидия в течение 15 минут.

Для оценки результатов гель фотографировали в проходящем УФ-свете, используя оранжевый светофильтр.

Определение содержания циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) методом преципитации в полиэтиленгликоле (ПЭГ). Содержание ЦИК в сыворотке крови определяли по методу Haskova и др. (1978) и Гриневич (Гриневич и Алферов, 1981). Метод основан на селективной преципитации комплексов антиген-антитело в 4,17% ПЭГ с молекулярной массой 6000, с последующим фотометрическим определением плотности преципитата.

Для проведения реакции готовили два раствора. Раствор 1 – это 0,1 М боратный буфер pH = 8,4 (3,41 г борной кислоты, 4,275 г буры растворяют в дистиллированной воде и доводят объём до 1 л). Раствор 2 готовили путем растворения 10 г реактива ПЭГ-6000 в 240 мл раствора 1. В пробирку вносили 0,3 мл сыворотки, добавили 0,6 мл раствора 1, тщательно перемешивали и переносили по 0,3 мл в 2 пробирки. В одну из них приливали 2,7 мл раствора 1 (контроль), в другую – 2,7 мл раствора 2 (опыт). Содержимое пробирок перемешивали и оставляли на 60 мин при комнатной температуре. Затем определяли оптическую плотность образцов на СФ-46 в кюветах размером 1×1 см при 450 нм. Высчитывали разность показателей ОП, результат выражали в единицах оптической плотности.

Выделение ЦИК методом преципитации в ПЭГ. За основу получения ЦИК из сывороток крови детей с АБА нами был взят метод Babián и др. (1984) и Golda и др. (2004).

0,5 мл сыворотки инкубировали с 0,5 мл 7,5 % ПЭГ в 0,1М боратном буфере в течение 1 часа при 4°C. Образовавшийся осадок промывали дважды раствором 3,5 % ПЭГа в 0,1М буфере, центрифугировали при 2500 об/мин в течение 20 мин при 4°C и впоследствии суспендировали в 0,5 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ). Суспензия ЦИК в ФСБ была затем растворена в 0,1М боратном буфере и использована для электрофореза в полиакриламидом геле.

Электрофоретический анализ белков ЦИК в полиакриламидном геле. Анализ белкового состава ЦИК исследовали методом электрофореза в полиакриламидном геле, содержащем DS-Na (Laemmli, 1970).

Гели, содержащие 3% и 11% акриламида (концентрирующий и разделяющий, соответственно), готовили с использованием 30% раствора акриламида и 0.8%

раствора метиленбисакриламида. Буфер концентрирующего геля содержал 0,125М трис-НСl (рН 6,8), буфер разделяющего геля – 0,375М трис-НСl (рН 8,8). Для полимеризации гелей использовали катализаторы – ТЕМЕД и персульфат аммония – каждый в количестве 0,025%. К анализируемому образцу добавляли раствор для разведения проб: 0,125М трис-НСl; 1% глицерин; 6% ДСН; 5% 2-меркаптоэтанол; 0,05% бромфеноловый синий (рН 6,8), в количестве 1/10 от объема вносимой пробы. Электрофорез проводили в вертикальном направлении при силе тока 30 мА в электродном буфере следующего состава: 0,025М трис, 0,192М глицин; 0,1% ДСН; (рН 8,3). По окончании электрофореза гель фиксировали в течение ночи в 20% растворе этанола на 7% CH_3COOH , после чего промывали и окрашивали 0,04% раствором кумасси G-250 на 35% HClO_4 .

Статистический анализ. Определяли величину асимметрии и эксцесса для оценки характера распределения данных. Так как распределение признака в большинстве выборок отличалось от нормального, для характеристики каждой выборки использовали показатели - медиана и перцентили (2,5; 25; 75; 97,5). Для сравнения данных применяли дисперсионный анализ, используя критерии Манна-Уитни и Крускала-Уоллиса, предусмотренные для сравнения ранжированных значений (Лакин, 1990; Акберова, 2004), с поправкой Бонферрони (Акберова, 2004) для исключения эффекта множественных сравнений. Взаимосвязь между параметрами оценивали с помощью коэффициента корреляции Спирмена (Лакин, 1990). Статистическая обработка выполнена с помощью пакета программ «Excel Office 2000».

Результаты собственных исследований и их обсуждение

Содержание антител к нДНК в сыворотке крови детей с atopической бронхиальной астмой. Нами исследовано содержание АТ к нДНК в сыворотке крови детей школьного возраста с АБА. Группа пациентов, находившаяся под наблюдением, включала 193 человека в возрасте от 7 до 17 лет, среди них мальчиков – 133, девочек – 60. Контролем служили результаты 21 относительно здорового подростка (15-17 лет) (табл. 2).

Таблица 2. Характеристика обследованного контингента

Характеристика группы	Дети с АБА (n – 193)	Контроль
Мальчики	133 (68,91%)	21
Девочки	60 (31,09%)	
Девочки:		
Препубертатный период	32 (16,5%)	
Пубертатный период	28 (14,51%)	
Мальчики:		
Препубертатный период	72 (37,31%)	
Пубертатный период	61 (31,62%)	

Сведения об уровнях содержания АТ к нДНК в сыворотке крови обследованных представлены на рис. 1.

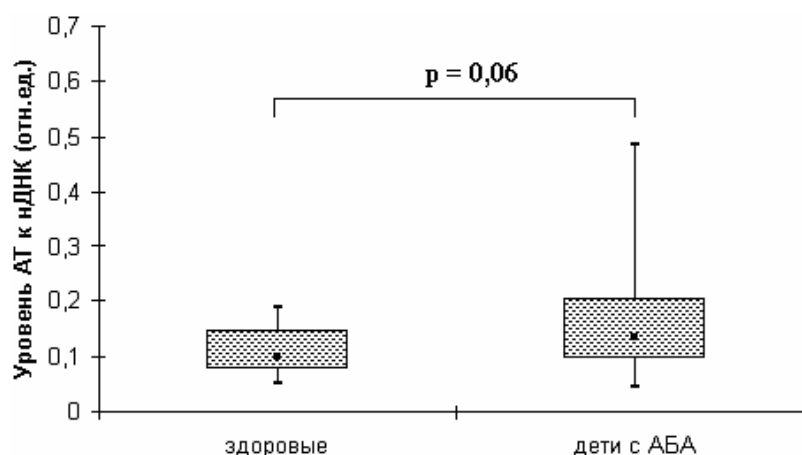
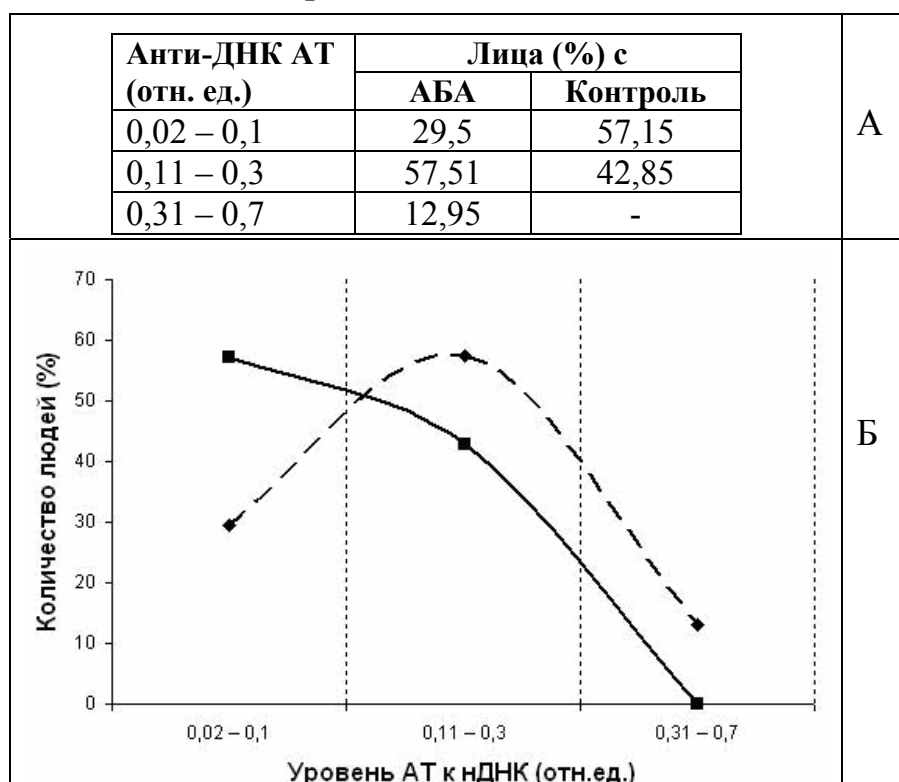


Рис.1. Уровень содержания АТ к нДНК у относительно здоровых лиц и детей с АБА

Обращает на себя внимание разброс индивидуальных показателей у детей с АБА. Среди относительных здоровых – от 0,02 до 0,22 отн.ед. Причем у 57 (29,5%) обследованных лиц уровень ААТ-IgG к нДНК составил от 0,02 до 0,1 отн.ед, у 86 (44,56%) – от 0,1 до 0,2 отн.ед., у 25 (12,95%) – от 0,2 до 0,3 и у 25 (12,95%) – от 0,3 до 0,7 отн.ед. в отличие от группы относительно здоровых лиц, содержание АТ к нДНК в которой составило от 0,03 до 0,1 у 12 человек (57,15%), от 0,1 до 0,2 у 6 человек (28,57%) и от 0,2 до 0,25 у 3 человек (14,28%).

Таблица 3. Уровень содержания ААТ к нДНК (А) и динамика изменения количества антител у детей с АБА и относительно здоровых лиц (Б):
[—] – здоровые, [-----] – с АБА.



Как следует из таблицы 3, высокое содержание анти-ДНК АТ в крови характерно только для группы детей с АБА ($\approx 13\%$). В контрольной группе почти у 60% обследованных лиц в крови обнаружен низкий уровень содержания АТ к нДНК. Обращает на себя внимание динамика изменения уровня АТ у относительно здоровых лиц и больных с АБА.

Далее был исследован характер распределения уровня АТ к нДНК при прогрессировании АБА, т.е. при лёгком, среднем и тяжёлом течении заболевания. Из рис.2 видно, что наблюдается значимая тенденция роста уровня содержания АТ к нДНК по мере усугубления течения АБА ($p < 0,01$).

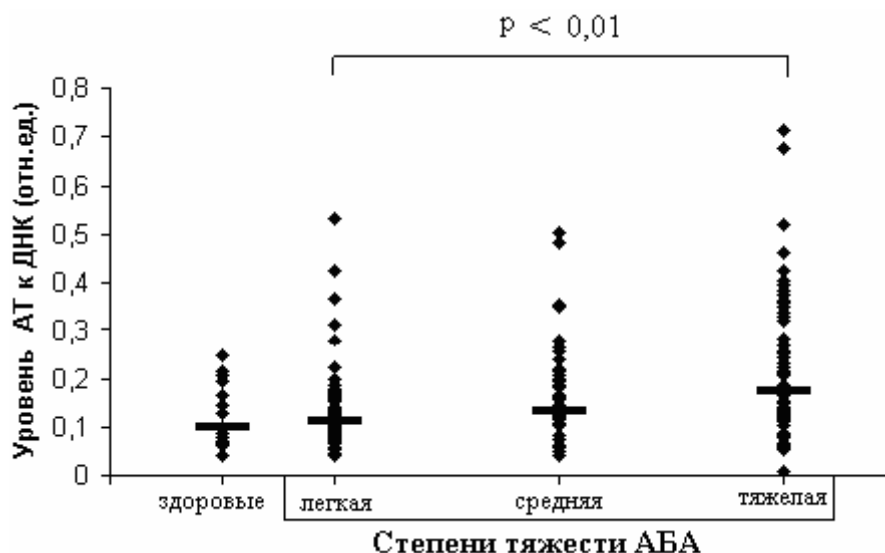


Рис. 2. Распределение уровней АТ к нДНК у обследованного контингента по степени тяжести АБА в общей выборки (— Me)

По данным литературы при сравнительном анализе результатов иммунологического обследования смешанной группы детей в возрасте от 1 до 15 лет отклонения средних показателей нивелируются от подобных у здоровых доноров. В то же время показано, что картина заболевания у детей с АБА может зависеть от пола больных (Васнева, 2003). Поэтому мы изучили уровень содержания АТ к нДНК у девочек и мальчиков.

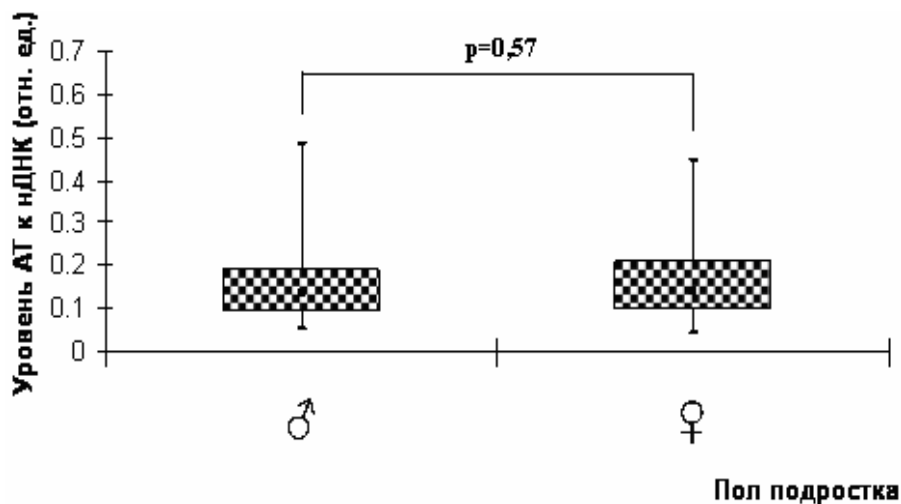


Рис.3. Уровень содержания АТ к нДНК у детей с АБА

Для более полной характеристики распределения выборки индивидуальных показателей уровня содержания АТ к нДНК у подростков разного пола использовали *Me*, 2,5-й, 25-й, 75-й и 97,5-й *перцентили* (*перц.*) (95%-ный доверительный интервал), между которыми расположено 95% значений уровня содержания АТ к нДНК (рис. 3).

Достоверной разницы в уровне содержания АТ к нДНК в сыворотке у девочек (*Me* = 0,14 отн. ед.; 2,5-й перц. = 0,04 отн. ед.; 25-й перц. = 0,10 отн. ед.; 75-й перц. = 0,21 отн. ед.; 97,5-й перц. = 0,45 отн.ед.) и мальчиков (*Me* = 0,14отн. ед.; 2,5-й перц. = 0,05 отн. ед.; 25-й перц. = 0,09 отн. ед.; 75-й перц. = 0,19 отн. ед.; 97,5-й перц. = 0,49 отн. ед.) обнаружено не было ($p = 0,57$) (рис.3).

Поэтому изучили изменение уровня содержания АТ к нДНК у подростков разного пола в зависимости от тяжести АБА.

По данным, представленным в таблице 4, видно, что различия в уровне содержания АТ к нДНК в крови становятся достоверными ($p \leq 0,05$) у подростков с АБА средней и тяжелой степени.

Таблица 4. Характеристика значимости результатов

Степень тяжести АБА	Количество (n)		Медиана (<i>Me</i>)		<i>p</i>
	♂	♀	♂	♀	
Легкая	56	22	0.12	0.10	0.30
Средняя	32	13	0.16	0.10	0.03
Тяжелая	45	25	0.14	0.20	0.05

Связано ли достоверное изменение количества АТ в сыворотке крови подростков только с прогрессированием тяжести астмы или с физиологическим состоянием детей в критические возрастные периоды?

Для этого были изучены изменения в количестве АТ к нДНК в сыворотке крови детей в препубертатный (7-11 лет у девочек и 8-12 лет у мальчиков) и пубертатный (12-16 лет у девочек и 13-17 у мальчиков) периоды (табл.5).

Таблица 5. Значимость различий в уровне антител к нДНК в сыворотке подростков

Возрастной период	♂	♀	P(♂/♀)
Препубертатный период (7-11 лет)	n = 72	n = 32	0,019
	Медиана		
	0,15	0,12	
Пубертатный период (12-17 лет)	n = 61	n = 28	0,013
	Медиана		
	0,13	0,17	
<i>P</i> (препубертатный / пубертатный)	0,075	0,18	

Сравнение результатов по количеству АТ в сыворотке детей в пре - и пубертатный периоды показало, что возрастные особенности, по-видимому, не влияют на уровень АТ к нДНК при АБА ($p_{(\text{препубертатный} / \text{пубертатный})} = 0,075$ у мальчиков и $p_{(\text{препубертатный} / \text{пубертатный})} = 0,18$ у девочек), однако различия в количестве АТ у девочек и мальчиков соответствующих возрастных периодов были достоверны ($p_{(\text{♂/♀})} = 0,019$ в препубертатный период и $p_{(\text{♂/♀})} = 0,013$ в пубертатный период).

На рис. 4 представлены результаты по уровню содержания АТ к нДНК в крови детей с АБА критических возрастных периодов в зависимости от степени тяжести заболевания.

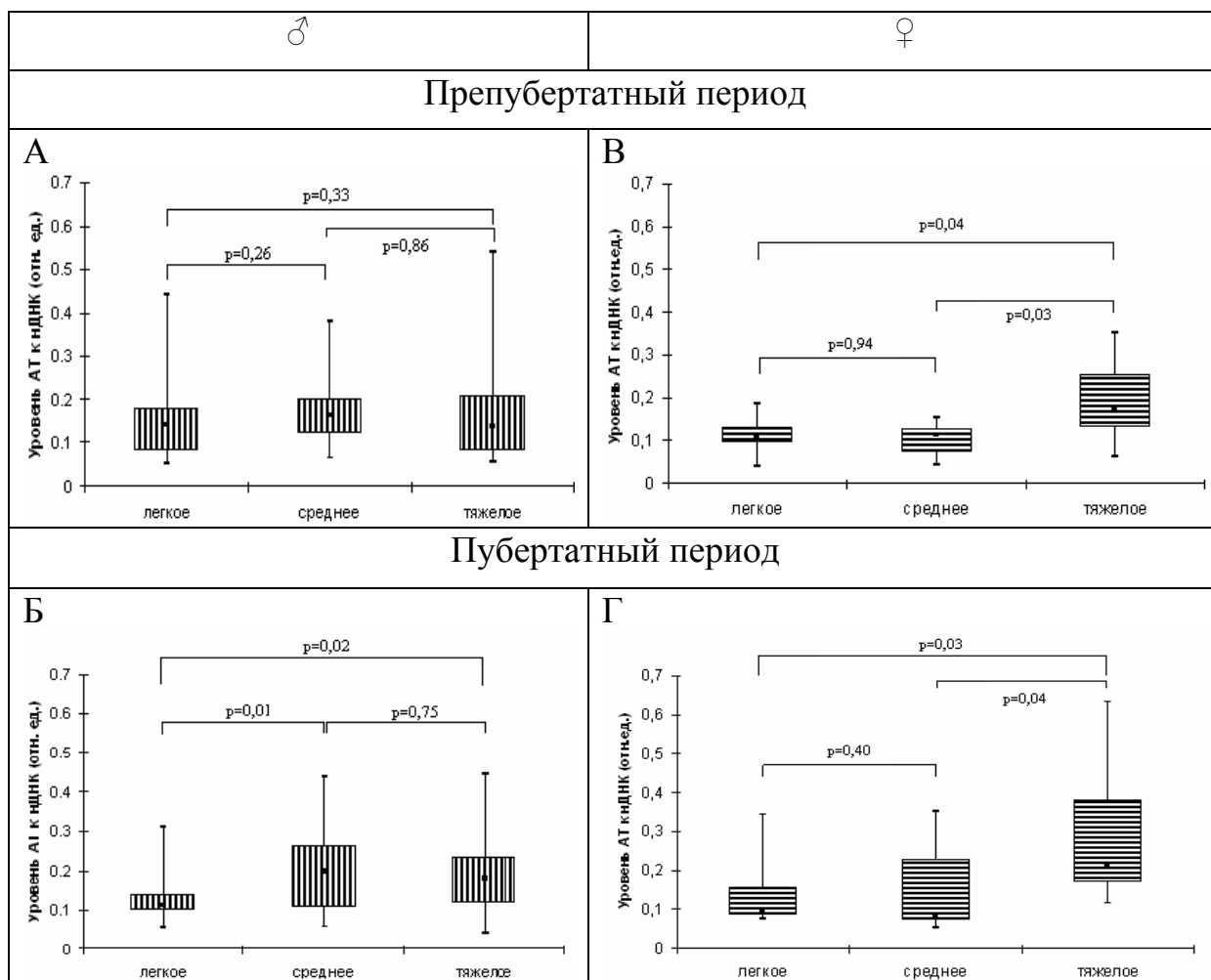


Рис.4. Сравнение изменения уровней АТ к нДНК в сыворотке детей с АБА в критические возрастные периоды жизни (препубертатный и пубертатный)

Результаты говорят о достоверности различий в уровнях АТ к нДНК между лёгким и тяжёлым течением АБА. Только у мальчиков препубертатного периода различия в уровнях АТ к нДНК в сыворотке были (по *Me*) не достоверны.

Поэтому, выявленные нами изменения уровней содержания АТ к нДНК у детей с АБА в различных возрастных группах были подвергнуты корреляционному анализу. В частности, мы изучили корреляционную

зависимость между уровнем АТ в сыворотке детей с АБА не только от пола и возраста, но и сезона года и тяжести течения болезни (рис. 5).

С помощью методов корреляционного анализа было показано: прямая корреляционная зависимость средней степени наиболее вероятно установлена между уровнем АТ к нДНК и тяжестью бронхиальной астмы ($p=0,0005$)

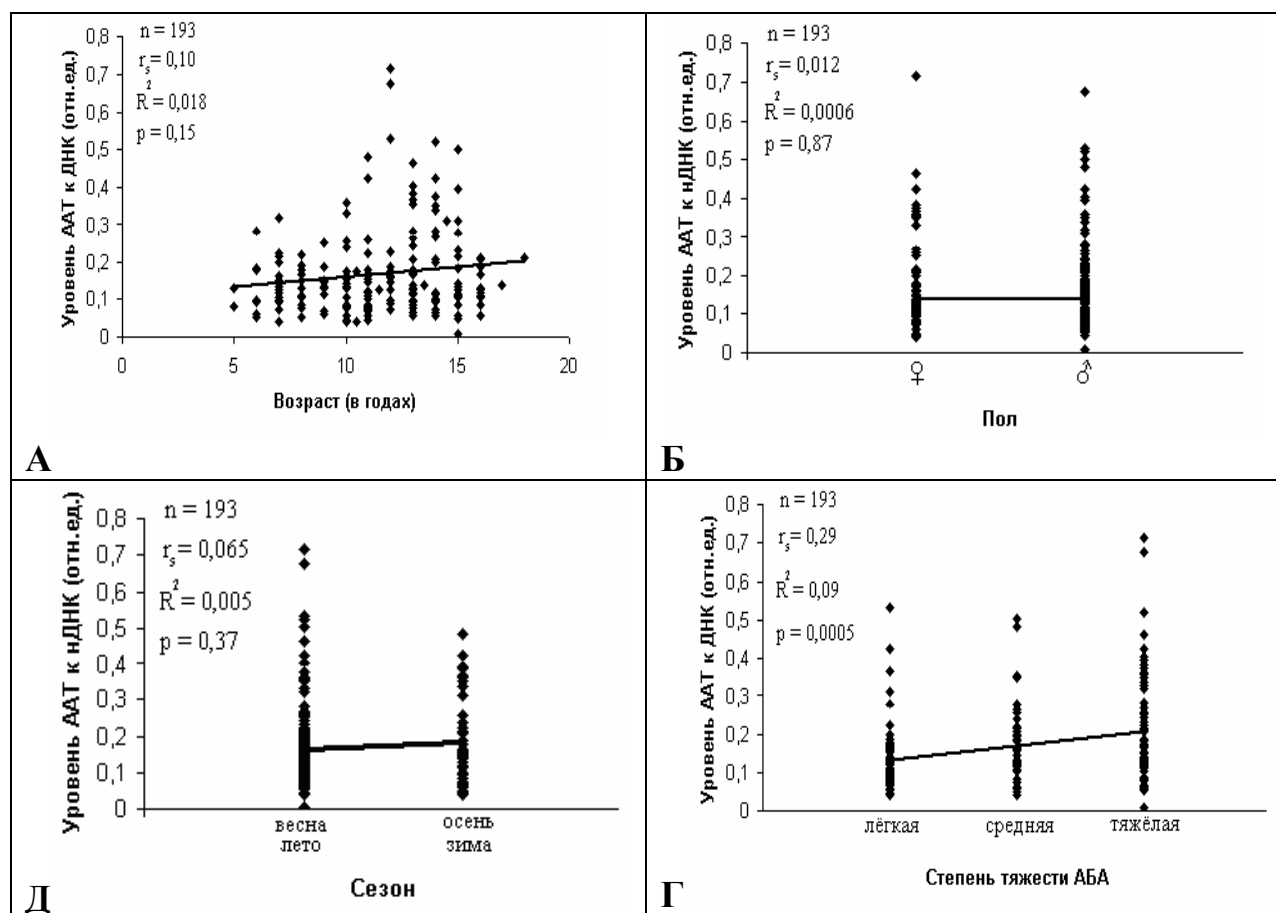


Рис.5. Объединенные результаты корреляционной зависимости между уровнем АТ к нДНК и возрастом (А), полом детей с АБА (Б), сезоном течения болезни (В), степенью тяжести (Г) астмы

Таким образом, уровень анти-нДНК IgG значительно увеличивается при прогрессировании тяжести астмы, а так как известно, что IgG обладают способностью фиксироваться в тканях, можно предположить, что это является одним из механизмов поражения тканей-мишеней при прогрессирующем течении заболевания и развития аутоиммунного варианта АБА.

Концентрация внеклеточной ДНК. Используя метод корреляционного анализа, мы проследили за изменениями концентрации внкДНК в зависимости от возраста детей с АБА, половой принадлежности лиц, времени обследования и степени тяжести АБА в общей группе детей ($n = 141$).

Было установлено, что концентрация внкДНК в сыворотке крови детей с АБА, по-видимому, не зависит от выше перечисленных факторов, о чем свидетельствуют данные рис.6.

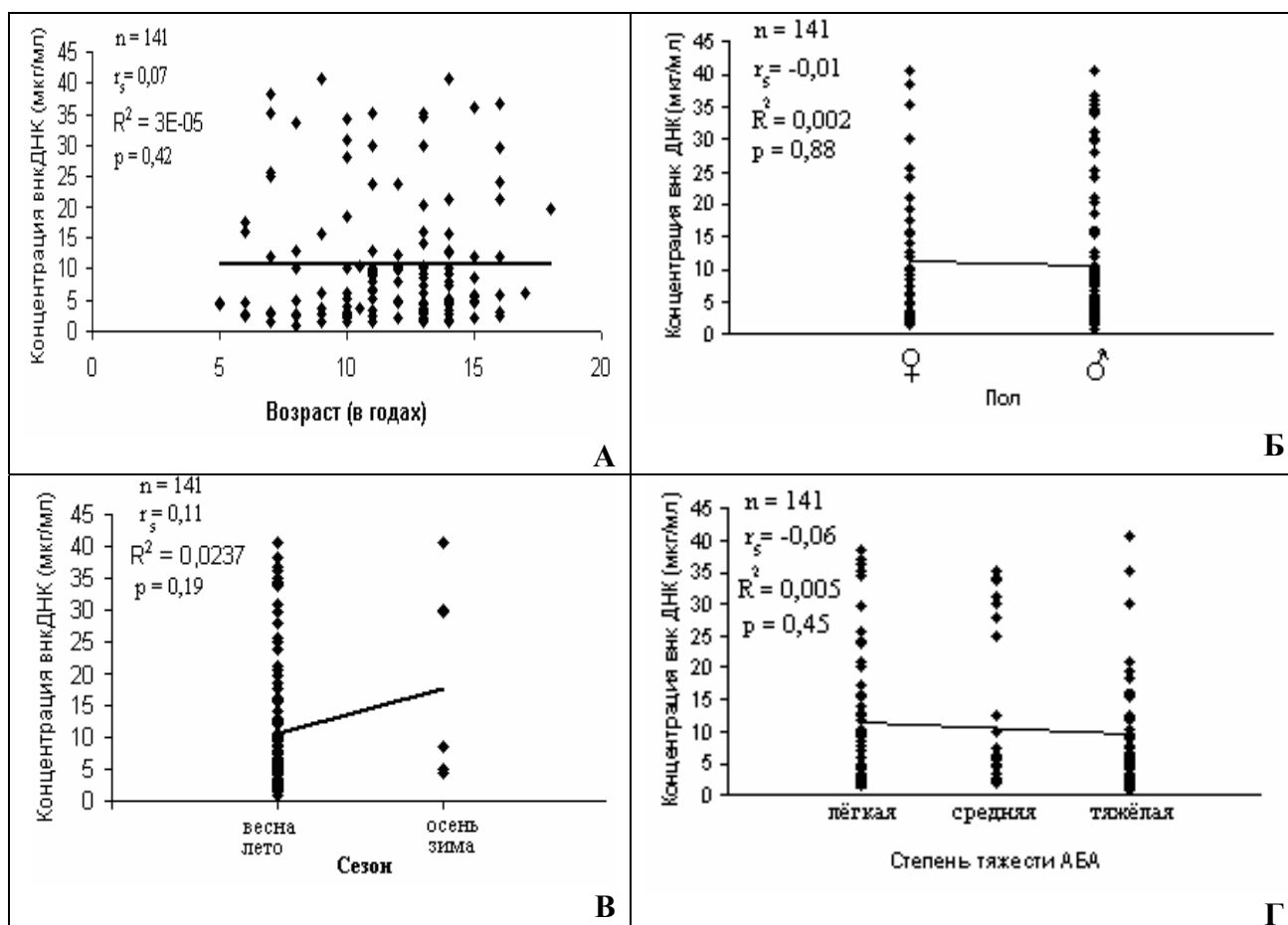


Рис.6. Зависимость между концентрацией внкДНК возрастом (А), полом детей с АБА (Б), сезоном течения болезни (В), степенью тяжести (Г) астмы

Однако нами была обнаружена значимая прямая корреляционная зависимость между концентрацией внкДНК и уровнем АТ к нДНК (рис.7). Обращает на себя внимание значение p (0,00006), что выражает очень высокую корреляционную связь между данными показателями.

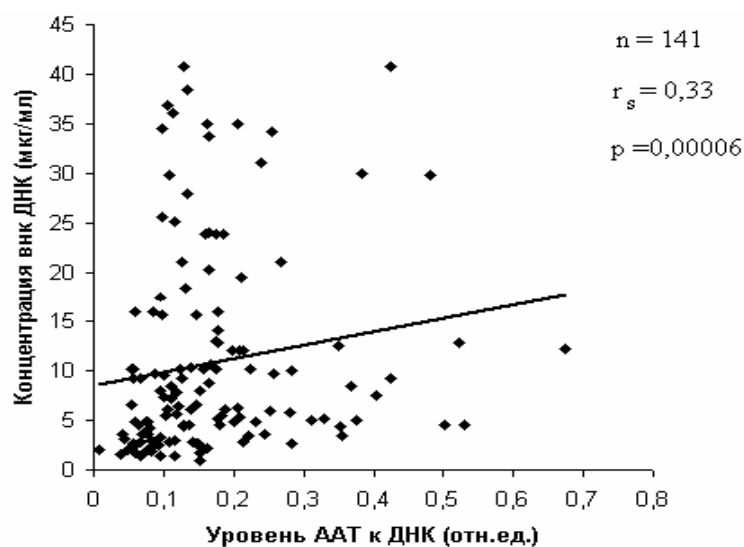


Рис.7. Зависимость между концентрацией внкДНК и уровнем ААТ к нДНК

Мы проследили изменение корреляционной связи между уровнем АТ к нДНК и внкДНК у больных лёгким, средним и тяжёлым течениями АБА (рис.8). Из рисунка 8 следует, что при лёгкой степени тяжести АБА корреляция между этими показателями не наблюдается ($p = 0,09$). При средней степени тяжести АБА между концентрацией внкДНК и уровнем АТ к нДНК появляется достоверная прямая корреляционная зависимость ($p=0,02$). При тяжёлой степени АБА положительная корреляция между указанными показателями приобретает ещё более высокую значимость ($p = 0,005$). Т.е. прослеживается тенденция роста корреляционной зависимости между концентрацией внкДНК и уровнем АТ к нДНК при прогрессировании АБА.

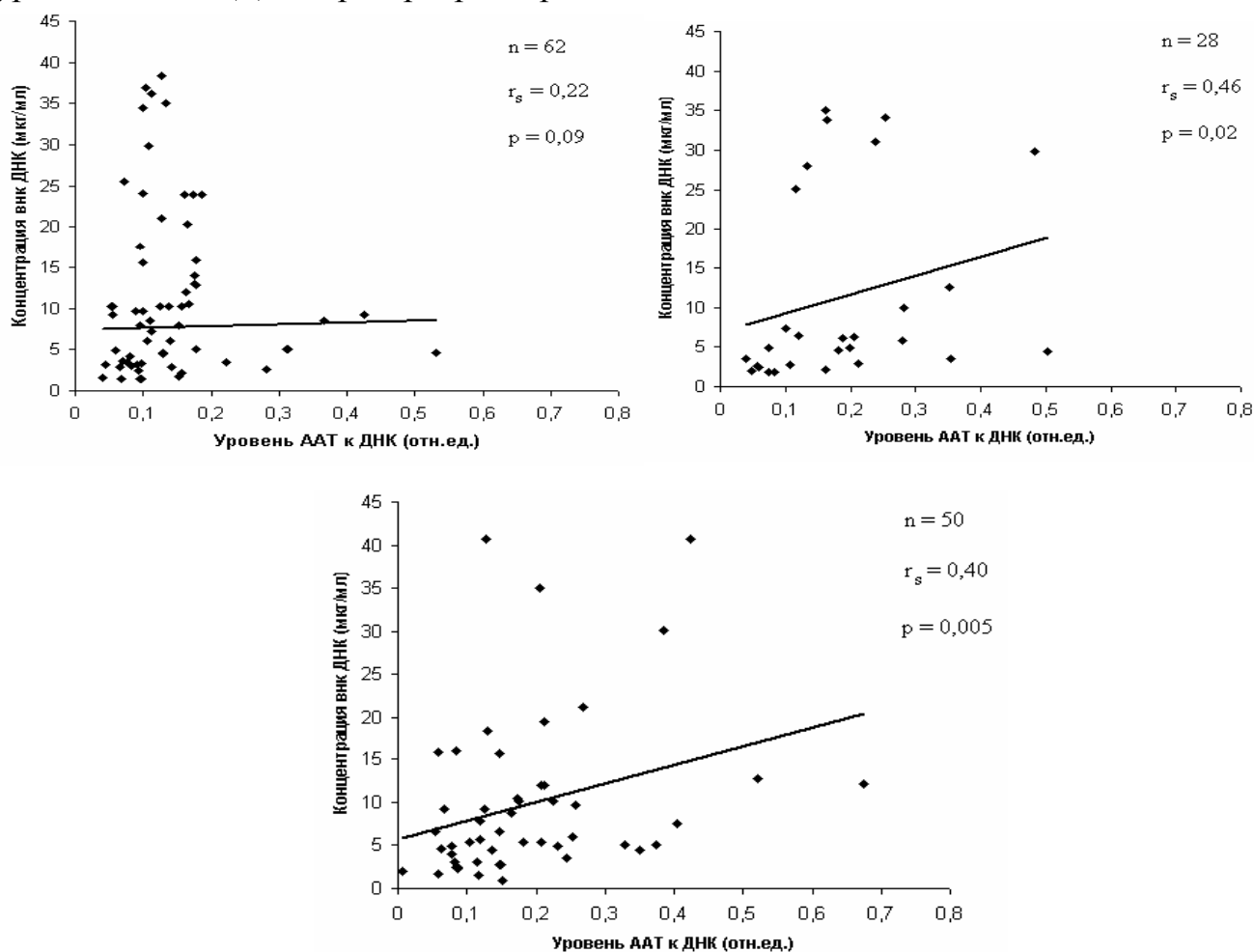


Рис.8. Корреляционная зависимость изменения концентрации внкДНК от уровня АТ к ДНК на разных степенях тяжести АБА

Выше мы показывали, что уровень АТ к нДНК достоверно увеличивается по мере прогрессирования АБА – от лёгкой к тяжёлой. Полученные данные о высокой степени зависимости между уровнем АТ к нДНК и концентрацией внкДНК позволяют предположить ДНК-зависимый характер иммунного ответа при АБА. Большая зависимость концентрации внкДНК от уровня ААТ к нДНК при тяжелой степени АБА, чем при лёгкой сопоставляется с более высоким уровнем АТ к нДНК при тяжёлой степени АБА, чем при лёгкой. На антиген-зависимый характер образования АТ к нДНК указывают и данные литературы (Mohan et al., 2001; Williams et al., 2001; Kubota et al., 2001; Сучков и др., 2004).

ДНК-гидролизующая активность АТ к нДНК при атопической бронхиальной астме у детей. Впервые природные каталитически активные АТ были обнаружены в крови пациентов с бронхиальной астмой к вазоактивному нейروпептиду (VIP-пептиду) (Paul et al., 1989), а затем АТ с ДНКазной активностью – в крови больных СКВ и других заболеваний (Nevinsky and Buneva, 2003).

В связи с этими данными обнаруженные АТ к нДНК в периферической крови детей с АБА были изучены на наличие каталитической активности.

ДНКазная активность АТ к нДНК оценивалась по их способности превращать субстрат – суперспиральную ДНК рВR322 (I) – в кольцевую (II) и линейную (III) формы (рис.9).

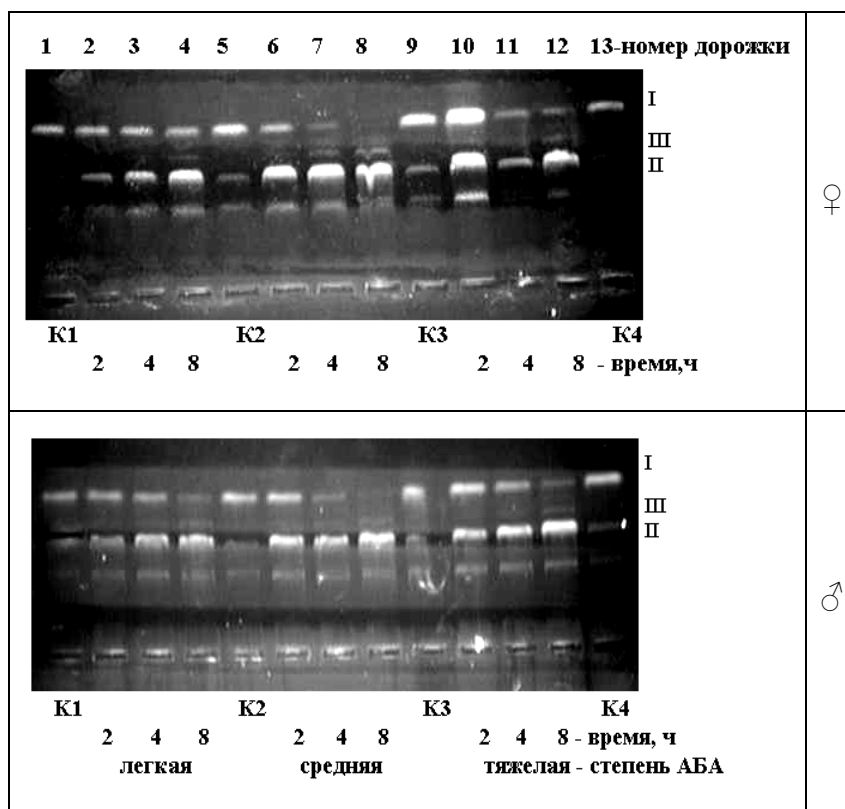


Рис.9. ДНК-гидролизующая способность АТ к нДНК у детей с АБА (♀ и -♂) в зависимости от степени тяжести заболевания:

Субстрат – рВR 322; K1 – субстрат + сыворотка относительно здорового подростка; K2 – субстрат в трис-НСl 25мМ, рН 7,5 без активаторов; K3 – субстрат + сыворотка больного АБА (0 ч реакции). K4 – субстрат без сыворотки в гидролизующем буфере (трис-НСl 25мМ, рН 7,5 /MgCl₂ 5мМ/NaCl 50мМ) через 8 ч реакции.

Если посмотреть на дорожки 2-4, 6-8 и 10-12 (рис.9), видно как падает количество суперспиральной ДНК (I форма) и нарастает количество продуктов ее расщепления, особенно, кольцевой (II форма) ДНК на протяжении 8 часов реакции.

Следует отметить, что наиболее активными оказались АТ из сыворотки крови больных со средне-тяжёлой степенью АБА. Наибольшие различия в активности АТ проявляются в первые 2ч реакции. Через 2ч фракция кольцевой

ДНК составляет уже свыше 80%. У отдельных образцов уровень кольцевой ДНК достигает через 4ч 93,2% и через 8ч снижается до 91,8%, при этом количество линейной формы (III) возрастает с 3,5 до 6,5%. Этот факт так же позволяет обратить внимание на характеристику средней тяжести АБА.

Различия по характеру расщепления субстрата и степени активности между АТ из сывороток периферической крови девочек и мальчиков показаны на рис. 10.

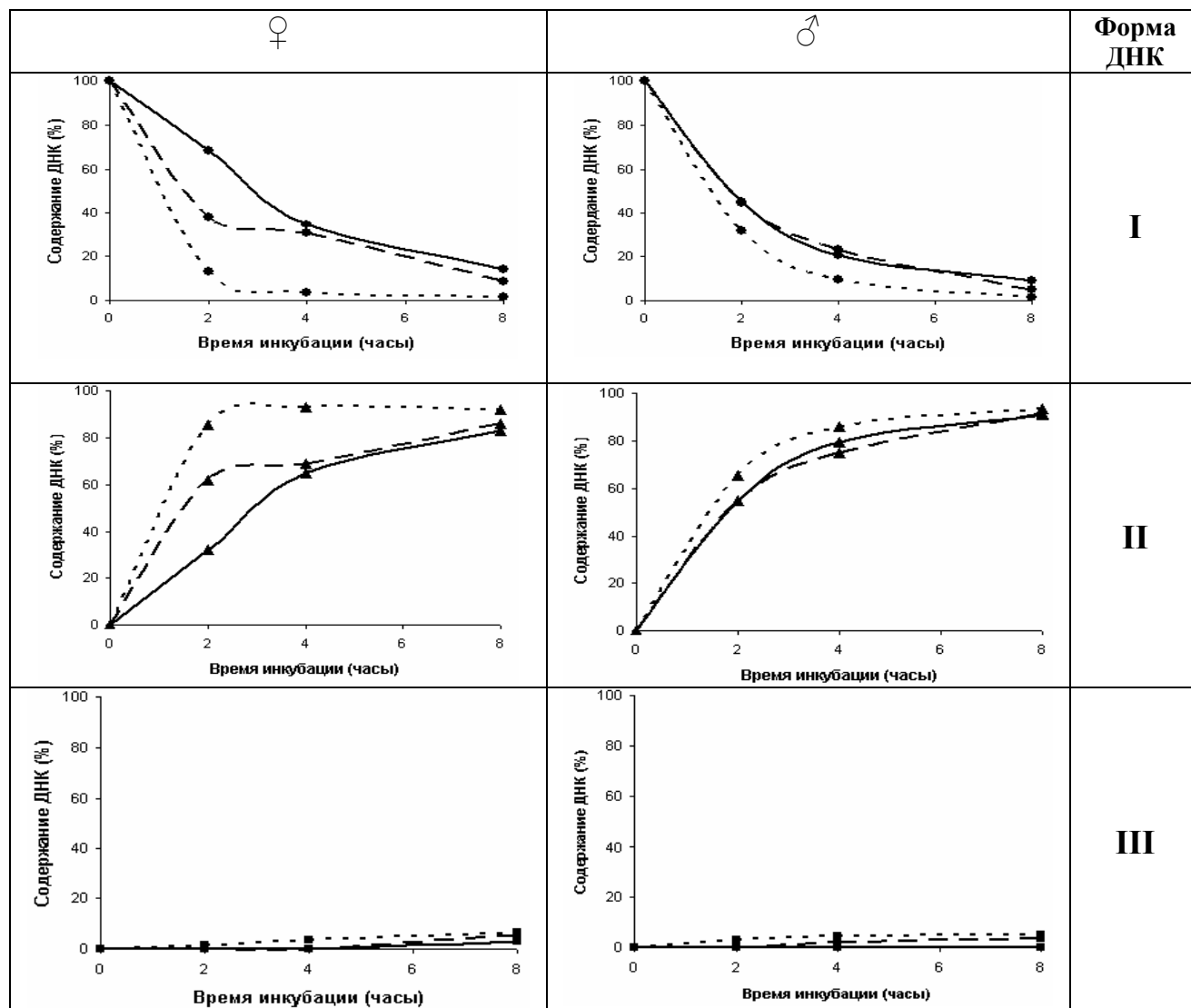


Рис. 10. Степень гидролиза ДНК плазмиды pBR 322 ДНК-абзимами сывороток крови девочек и мальчиков с АБА на разных степенях тяжести (——— – лёгкое течение, - - - - - – среднее течение, — — — – тяжёлое течение)

Как следует из результатов рис. 10 анти-ДНК АТ сыворотки крови больных с АБА обладают ДНК-гидролизующей активностью. По характеру гидролиза плазмидной ДНК pBR 322 следует, что эти абзимы преимущественно расщепляют одноцепочечные участки, так как только через 8ч реакции появляется фракция линейной ДНК (III форма) в количестве 3 – 6,5% от суммарной фракции суперспиральной формы (I) ДНК.

Существенной динамики в уровне активности в зависимости от тяжести АБА не обнаружено.

Таким образом, установлены признаки аутоиммунного развития у детей с АБА средней и тяжелой степени – наличие АТ к нДНК с каталитической активностью в сыворотке периферической крови. В связи с этим анализ ДНКазной активности АТ к нДНК может стать дополнительным критерием при характеристике течения астмы, ее тяжести и, возможно, оценке эффективности проводимого лечения.

Содержание и белковый состав циркулирующих иммунных комплексов в крови у детей больных atopической бронхиальной астмой. Нами исследовано содержание ЦИК в сыворотке крови детей школьного возраста с АБА. Группа доноров, находившаяся под наблюдением, включала 173 человека в возрасте от 7 до 17 лет, среди них мальчиков – 133, девочек – 60. Контролем служили 11 относительно здоровых подростка (15-17 лет).

Результаты исследований (рис. 11) свидетельствуют о том, что в крови детей с АБА наблюдается достоверное, по сравнению с контролем, повышение концентрации ЦИК (по значениям *Me* 0,03 СФ-ед. – у здоровых лиц и 0,06 СФ-ед. – у детей с АБА).

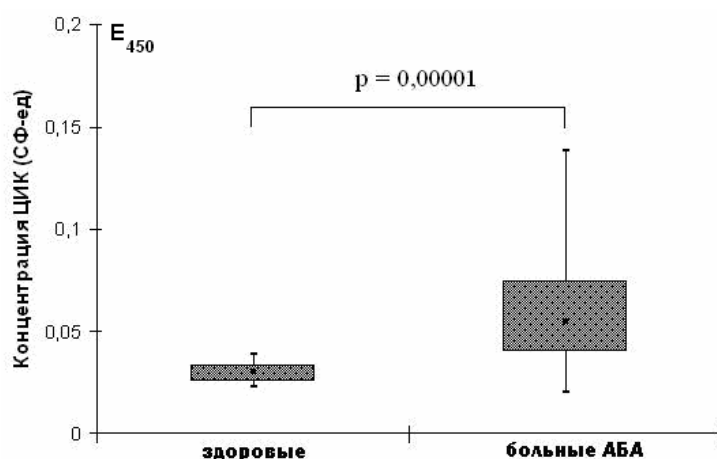


Рис.11. Содержание ЦИК в крови детей с АБА и в контрольной группе

Далее мы решили исследовать содержание ЦИК в крови детей с АБА в зависимости от степени тяжести заболевания (рис.12).

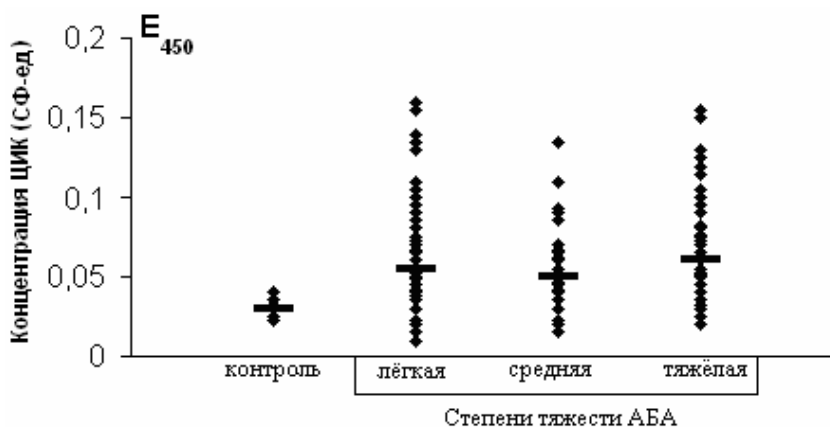


Рис.12. Концентрации ЦИК в сыворотке крови детей больных АБА на разных степенях тяжести («—» *Me*)

Изменения средних уровней ЦИК (по *Me*) в сыворотке крови детей при лёгкой, средней и тяжёлой степенях АБА не были однотипными. Концентрация ЦИК в сыворотке возрастала в 1,8 раза при лёгком, в 1,6 – при среднем и в 2 раза при тяжелом течении АБА. В работе (Рудык, Барановский, 1984) при изучении содержания ЦИК при тяжелом течении неатопической БА было показано, что если пределы колебания концентрации ЦИК у больных в 1,3-1,6 раза выше по сравнению со здоровыми, следует считать эти показания зоной риска развития аутоиммунных реакций. Если концентрация их превышает эту величину, то наличие аутоиммунного компонента становится достоверным.

Одной из важных характеристик ЦИК является их размер (Nezlin, 2000). При анализе соотношения иммунных комплексов различной молекулярной массы наиболее патогенными считают ЦИК средних размеров, которые образуются при незначительном избытке антигена (Чернушенко и др., 2002). Содержание патогенных субфракций в общей популяции ЦИК оценивали методом П.В. Стручкова и соавт. [1985], основанным на определении коэффициента размера ЦИК по формуле: $K=K_2/K_1$, где K_1 и K_2 – концентрации ЦИК, осаждённых соответственно 3% и 4% ПЭГ. Для определения размеров ЦИК были приняты следующие критерии: комплексы считали крупными при $1 < K < 1,1$, средними – при $1,1 < K < 1,5$, мелкими – при $K > 1,5$.

При определении размера ЦИК у детей с АБА было установлено, что у 85,6% детей с АБА в крови и встречаются мелкие и средние по размеру ЦИК. Причём, у больных с лёгкой степенью преобладали мелкие комплексы (62,12%), со средней и тяжёлой степенями астмы – комплексы среднего размера (59% и 51,7%, соответственно). В контрольной группе у 86% лиц встречались комплексы крупного размера, а у 14 % – ЦИК среднего размера (табл. 5).

Таблица 6. Встречаемость ЦИК среди детей с АБА в зависимости от молекулярной массы (n – количество детей)

Размер ЦИК	Степень тяжести АБА			Контроль
	Лёгкая (n = 66)	Средняя (n = 39)	Тяжёлая (n = 58)	
Мелкие	n = 41 (62,12%)	n = 10 (25,64%)	n = 24 (41,38%)	n = 0 (0%)
Средние	n = 15 (22,72%)	n = 23 (59%)	n = 30 (51,7%)	n = 2 (14%)
Крупные	n = 10 (15,16%)	n = 6 (15,36%)	n = 4 (6,92%)	n = 12 (86%)

Определенное диагностическое значение имеет коэффициент аутоиммунизации (K_A), предложенный Рудыком и Барановским (Рудык и Барановский, 1984), который определяют по формуле: $K_A = \frac{C_{\text{ЦИК (исследуемой-сыворотки)}}}{C_{\text{ЦИК (контроля)}}$.

При K_A равном 1,5 – 4,0 считается доказанным участие иммунопатологических реакций в патогенезе болезни, в том числе и аутоиммунной патологии.

Определение K_A при лёгком, среднем и тяжелом течениях астмы по значениям *Me* концентраций ЦИК в сыворотке крови детей с АБА и контрольной группе показала, что коэффициент аутоиммунизации составляет в среднем 1,8, что показывает участие иммунопатологических реакций в патогенезе АБА.

Итак, проведенные исследования показали, что у детей больных АБА:

- отмечается повышение концентрации ЦИК;
- происходит изменение соотношения ЦИК в сторону преобладающего формирования ЦИК мелко- и среднедисперсных размеров;
- степень уменьшения дисперсности коррелирует с тяжестью астмы.

Ещё в ранних работах были предприняты попытки найти связь между уровнем сывороточных иммуноглобулинов и ЦИК (Digeon et al., 1977). Позднее было выявлено, что образование ЦИК зависит от АТ, принадлежащих к различным классам иммуноглобулинов (Вельбри и др., 1988; Иванов и др., 2004). При воспалительных процессах отмечали прямую корреляцию между уровнем ЦИК и IgM, при аутоиммунных заболеваниях наблюдалась положительная корреляция между уровнем ЦИК и IgG.

Методом ИФА нами было показано, что у детей с АБА повышен уровень АТ-IgG к нДНК. С помощью методов корреляционного анализа мы выявили статистически достоверную прямую зависимость образования ЦИК от АТ к нДНК (рис. 13). Как было показано выше, у больных АБА в крови преобладают патогенные мелко- и среднедисперсных размеров ЦИК. Иммунные комплексы среднемoleкулярной массы могут активировать систему комплемента по альтернативному пути, и тем самым способствует поддержанию воспалительного процесса в бронхолегочной системе (Чернушенко и Фещенко, 2002; Фролов и Соцкая, 2003).

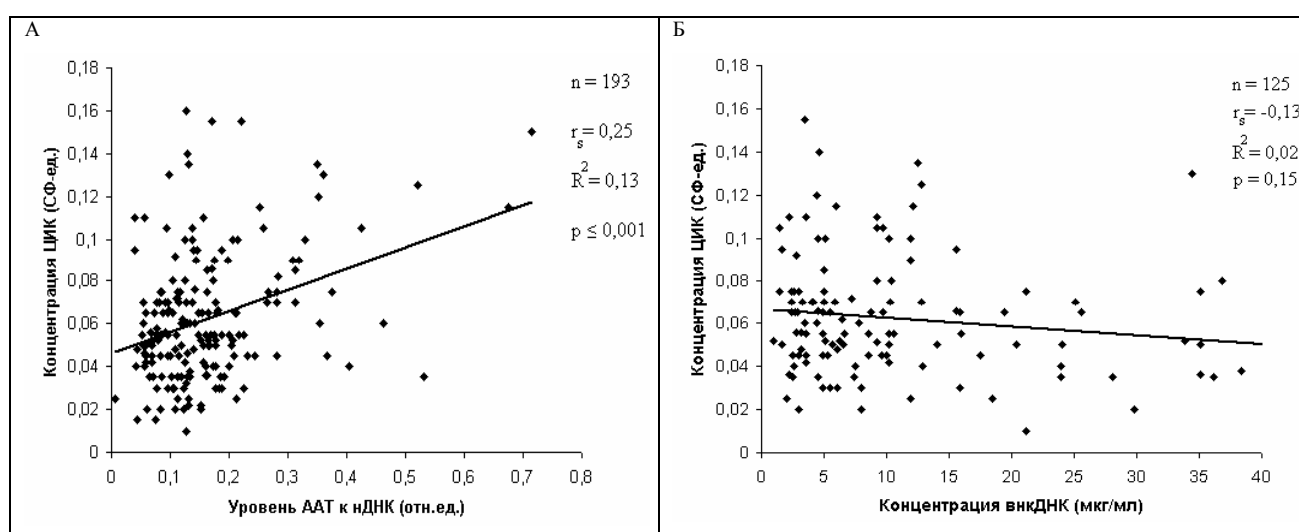


Рис.13. Зависимость между уровнем АТ к нДНК (А) и антигена-нДНК (Б) и концентрацией ЦИК в сыворотке крови детей с АБА

У больных АБА выявлено наличие в циркуляции средних, наиболее патогенных ЦИК, которые образуются при незначительном избытке антигена. В норме происходит процесс постоянного укрупнения ЦИК за счет эквивалентного соотношения антигенов и антител и, соответственно, их элиминация. В связи с этим следует отметить, что мы обнаружили прямую корреляционную связь между концентрацией ЦИК и уровнем АТ к нДНК и обратную – между концентрацией ЦИК и концентрацией внДНК в крови, что

позволяет сделать предположение об отсутствии эквивалентного соотношения антигенов и антител при прогрессировании тяжести астмы.

Обращает на себя внимание отсутствие корреляционной связи как между циркулирующими АТ к нДНК и ЦИК, так и между циркулирующей ДНК и ЦИК в отсутствии патологии. Это дает основание предполагать, что циркулирующие иммунные комплексы и антитела к ДНК как результат развития аутоиммунных реакций играют существенную роль в патогенезе поздних осложнений астмы.

ВЫВОДЫ

1. У детей с atopической бронхиальной астмой в сыворотке крови присутствуют антитела к нативной ДНК. Уровень анти-ДНК IgG значительно увеличивается при прогрессировании тяжести астмы, а так как известно, что IgG обладает способностью фиксироваться в тканях, можно предположить, что это является одним из механизмов поражения тканей-мишеней при прогрессирующем течении заболевания.

2. В сыворотке крови детей с АБА концентрация внеклеточной ДНК коррелирует с уровнем АТ к нДНК, причем корреляционная зависимость возрастает в зависимости от степени выраженности патологии, что может говорить о ДНК-зависимом иммунном ответе при АБА.

3. При средней и тяжелой персистирующей АБА АТ к нДНК проявляют ДНК-гидролизующую активность.

4. В сыворотке крови детей с АБА

- отмечается повышение концентрации ЦИК;
- происходит изменение соотношения ЦИК в сторону формирования мелко- и среднedisперсных размеров;
- степень увеличения концентрации ЦИК и уменьшения их дисперсности коррелирует с тяжестью течения АБА.

5. Коэффициент аутоиммунизации (1,8) у исследуемой группы свидетельствует о наличии аутоиммунных механизмов развития АБА у детей критических возрастных периодов.

Итак, концепция относительно ведущей роли иммунных процессов в патогенезе АБА имеет широкое признание, вместе с тем диагностическая и прогностическая значимость отдельных показателей иммунной системы оставалась недостаточно изученной, в частности, накопление в жидких средах организма анти-ДНК IgG, абзимов с ДНКазной активностью, внкДНК и ЦИК. Полученные в данной работе результаты позволяют говорить, что они играют несомненную роль в патогенезе аутоиммунных процессов при АБА.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Аддисон, Д. Изучение аутоиммунного ответа при бронхиальной астме / В.А. Солозובה, **Р.А. Курбанов**, З.И. Абрамова, В.Г. Винтер // Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии: Материалы научно-практической конференции. Казань, 17-18 июня 2004 г. Труды молодых ученых / Под ред. Р.Г.Василова. – М.: «Русская панорама», 2004.–С.4-9.
2. **Курбанов, Р.А.** Иммунная система организма. Атопические и аутоиммунные заболевания. Апоптоз. / **Р.А. Курбанов**, З.И. Абрамова // Рус. – Деп. в ВИНТИ. – №1623. – В 2005. – 73 с.
3. **Курбанов, Р.А.** Уровень аутоантител к ДНК при бронхиальной астме у детей ювенильного возраста / **Р.А. Курбанов**, З.И. Абрамова // Рус. – Деп. в ВИНТИ. – №1622. – В 2005. – 25 с.
4. **Курбанов, Р.А.** Характеристика уровней аутоантител к нативной ДНК и внеклеточной ДНК у детей школьного возраста при бронхиальной астме // Научно-практическая конференция молодых ученых: Тезисы докладов. Казань, 19 апреля 2006 г. / Под ред. д.м.н., профессора А.П. Цибулькина. – Казань, 2006. – С.17 – 19.
5. **Курбанов, Р.А.** Изучение гидролизующей активности антител к ДНК и ДНКаз лимфоцитов больных бронхиальной астмой / **Р.А. Курбанов**, М.М.Д. Нсангу // VI Научная конференция молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета «Материалы и технологии XXI века». Тезисы докладов. Казань, 28 апреля 2006 г. – Казань: Казанский государственный университет им. В.И.Ульянова-Ленина, 2006. – С.67.
6. **Курбанов, Р.А.** Изучение уровня антител к ДНК и внеклеточной ДНК при бронхиальной астме / **Р.А. Курбанов**, З.И. Абрамова // Биология-наука XXI века: сб. тез / 10-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых.- Пущино, 2006. – С.26.
7. **Курбанов, Р.А.** Аутоантитела к нативной ДНК при атопической бронхиальной астме у детей. /Р.А.Курбанов, З.И.Абрамова, В.Н.Цибулькина, Г.М.Зайнетдинова // Казанский медицинский журнал. – 2007. – Т. 88. – № 3. – С. 224-228.
8. **Курбанов, Р.А.** Содержание внеклеточной ДНК в периферической крови у детей критического возрастного периода при атопической бронхиальной астме / **Р.А. Курбанов**, З.И.Абрамова // Ученые записки Казанского государственного университета. – 2007. – Т. 149. – Кн.1. – С. 17-25.
9. Fakhrullin, R.F. Quartz crystal microbalance immunosensor for the detection of antibodies to double-stranded DNA / R.F. Fakhrullin, V.G. Vinter, A. Zamaleeva, M. Matveeva, **R.A. Kourbanov** et al. // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – March, 2007. – Published online. – Article DOI: 10.1007/s00216-007-1230-2.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ – антиген
АТ – антитело
ААГ – аутоантиген
ААТ – аутоантитело
АБА – атопическая бронхиальная астма
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
внкДНК – внеклеточная дезоксирибонуклеиновая кислота
нДНК – нативная дезоксирибонуклеиновая кислота
ИК – иммунный комплекс
ИФА – иммуноферментный анализ
КАТ – каталитическое антитело
Отн.ед. – относительные единицы
ОП₄₉₂ – оптическая плотность при длине волны 492 нм в реакции ИФА
ПЭГ – полиэтиленгликоль
СКВ – системная красная волчанка
СФ-ед. – спектрофотометрические единицы
ФСБТ – фосфатно-солевой буфер с твином
ЦБ – цитратный буфер
ЦИК – циркулирующие иммунные комплексы
VIP (Vasoactive Intestinal Peptide) – вазоактивный кишечный нейропептид

e-mail: bio-tem@mail.ru

Факс: +7(843)2387121